Il dimetilsolfossido danneggia l'integrità mitocondriale e il potenziale della membrana negli astrociti in coltura

Chan Yuan, Junying Gao, Jichao Guo, Lei Bai, Carlo Marshall, Zhiyou Cai, Linmei Wang, Ming Xiao

Pubblicato: 19 settembre 2014 • https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447

Astratto

Il dimetilsolfossido (DMSO) è un solvente organico polare che viene utilizzato per dissolvere agenti neuroprotettivi o neurotossici nella ricerca neuroscientifica. Tuttavia, lo stesso DMSO ha anche effetti farmacologici e patologici sul sistema nervoso. Gli astrociti svolgono un ruolo centrale nel mantenimento dell'omeostasi cerebrale, ma l'effetto e il meccanismo del DMSO sugli astrociti non sono stati studiati. Il presente studio ha mostrato che l'esposizione delle colture di astrociti all'1% di DMSO per 24 ore non ha influenzato in modo significativo la sopravvivenza cellulare, ma ha ridotto la vitalità cellulare e l'espressione del trasportatore del glutammato gliale e ha causato gonfiore mitocondriale, compromissione del potenziale di membrana e produzione di specie reattive dell'ossigeno e conseguente citocromo rilascio c e attivazione della caspasi-3. Il DMSO a concentrazioni del 5% ha inibito significativamente la variabilità cellulare e promosso l'apoptosi degli astrociti, accompagnato da un danno mitocondriale più grave. Questi risultati suggeriscono che la compromissione mitocondriale è un evento primario nella tossicità degli astrociti indotta da DMSO. I potenziali effetti citotossici sugli astrociti devono essere considerati attentamente durante lo studio degli effetti neuroprotettivi o neurotossici degli agenti idrofobici disciolti dal DMSO.

Citazione: Yuan C, Gao J, Guo J, Bai L, Marshall C, Cai Z, et al. (2014) Il dimetilsolfossido danneggia l'integrità mitocondriale e il potenziale della membrana negli astrociti coltivati. PLoS ONE 9(9): e107447. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447

Editore: Shilpa J. Buch, University of Nebraska Medical Center, Stati Uniti d'America

Ricevuto: 28 aprile 2014; **Accettato:** 10 agosto 2014; **Pubblicato:** 19 settembre 2014

Copyright: © 2014 Yuan et al. Questo è un articolo ad accesso aperto distribuito secondo i termini della Creative Commons Attribution License , che consente l'uso, la distribuzione e la riproduzione illimitati con qualsiasi mezzo, a condizione che l'autore e la fonte originali siano accreditati.

Disponibilità dei dati: gli autori confermano che tutti i dati alla base dei risultati sono completamente disponibili senza restrizioni. Tutti i dati rilevanti sono inclusi nel documento.

Finanziamento: il finanziamento è stato fornito dalla National Natural Science Foundation of China (81271210) e dal progetto Qing Lan degli istituti di istruzione superiore dello Jiangsu. I finanziatori non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio, nella raccolta e nell'analisi dei dati, nella decisione di pubblicare o nella preparazione del manoscritto.

Interessi in competizione: gli autori hanno dichiarato che non esistono interessi in competizione.

introduzione

Il dimetilsolfossido (DMSO) è un solvente organico polare con varie funzioni biologiche ampiamente utilizzato nella ricerca sia biologica che medica [1] , [2] . Nel campo delle neuroscienze, il DMSO è comunemente usato per dissolvere agenti neuroprotettivi o neurotossici idrofobici [3] . Gli studi hanno anche studiato i potenziali effetti del DMSO stesso sul sistema nervoso [4] – [8] . È stato dimostrato che il trattamento con DMSO riduce il volume dell'infarto e la perdita neuronale nei modelli di ischemia cerebrale dei roditori [9] – [11] . Tuttavia, è stato dimostrato che il DMSO produce un'apoptosi neuronale diffusa nel cervello del topo in via di sviluppo e una perdita neuronale nella coltura dell'ippocampo di ratto[12] . Il DMSO può anche indurre l'iperfosforilazione della tau, un segno distintivo del morbo di Alzheimer, nel cervello di topo adulto [13] . Il DMSO produce una riduzione dose-dipendente della velocità di conduzione nervosa con l'interruzione della mielina del nervo sciatico del ratto [4] . Questi dati discrepanti suggeriscono che il DMSO svolge ruoli protettivi o dannosi nel cervello, il che potrebbe essere dovuto a differenze nel modello utilizzato e alla concentrazione di DMSO somministrato.

Inoltre, ci sono diversi casi clinici che rivelano grave neurotossicità [14] – [18] , encefalopatia [19] – [21] e amnesia globale transitoria [22] associata all'infusione di cellule staminali/progenitrici ematopoietiche criopreservate con DMSO. Questi risultati suggeriscono fortemente che il DMSO ha effetti collaterali neurologici e tossicità. Pertanto, è necessario esplorare ulteriormente gli effetti neurofarmacologici e neurotossicologici del DMSO.

Gli astrociti, le cellule gliali più numerose nel cervello dei mammiferi, sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi cerebrale [23] . Ad esempio, gli astrociti regolano la neurotrasmissione glutamatergica e prevengono l'eccitotossicità del glutammato rimuovendo il glutammato in eccesso dallo spazio sinaptico extracellulare attraverso i trasportatori del glutammato [24] . La disfunzione degli astrociti è stata implicata in una varietà di malattie neurologiche [25] . Sulla base di ciò, è necessario studiare gli effetti del DMSO sugli astrociti. Tuttavia, a nostra conoscenza, questo problema non è stato esplorato.

Nel presente studio abbiamo fornito prove che il DMSO ha effetti citotossici sugli astrociti attraverso l'interruzione dell'integrità mitocondriale e del potenziale di membrana, con conseguente stress ossidativo, apoptosi e down-regulation dei trasportatori del glutammato. Questa scoperta amplia la nostra comprensione dei meccanismi neurotossici del DMSO e fornisce una base sperimentale per selezionare una dose sicura di DMSO nella ricerca neuroscientifica.

Risultati

Il DMSO ha ridotto la sopravvivenza e la vitalità degli astrociti in coltura

Il DMSO a concentrazioni dello 0,5–1,5% è ampiamente utilizzato come solvente per vari agenti farmacologici nella ricerca neuroscientifica [3] . Pertanto, abbiamo selezionato DMSO a concentrazioni dell'1% e del 5% per osservare e confrontare il loro profilo neurotossico negli astrociti in coltura durante un periodo di esposizione di 24 ore. L'esposizione delle colture all'1% di DMSO non ha avuto effetti significativi sulla crescita e sulla sopravvivenza degli astrociti, ma la vitalità cellulare è stata ridotta del 16%, come rivelato da 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5- saggio di difeniltetrazolio bromuro (MTT). Il DMSO a concentrazioni del 5% ha causato una diminuzione del 40% della densità cellulare e una diminuzione del 32% della vitalità cellulare (Figura 1A–C).

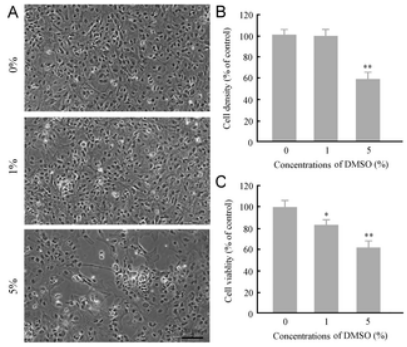

Figura 1. Effetti del DMSO sulla sopravvivenza e sulla vitalità degli astrociti corticali del topo in coltura.
(**A**) Profilo di crescita generale di incubato con varie concentrazioni di DMSO per 24 h. Gli astrociti sono stati cresciuti bene e hanno aderito strettamente l'uno all'altro sulla superficie dei vetrini coprioggetto in circostanze normali ed esposti all'1% di DMSO. Molti astrociti sono stati staccati dai vetrini coprioggetto nel mezzo di coltura DMSO al 5%. (**B–C**) Analisi quantitativa della densità cellulare (B) e della vitalità cellulare (C) di astrociti incubati con diverse concentrazioni di DMSO per 24 h. I dati sono mostrati come media ± SEM di cinque esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. * *P* <0,05 e ** *P* <0,01 rispetto al gruppo di controllo.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447.g001

Il DMSO ha alterato l'integrità mitocondriale e il potenziale di membrana degli astrociti in coltura

È stato dimostrato che il DMSO modula in modo dipendente dalla concentrazione la struttura e le proprietà delle membrane cellulari [26] , [27] . La membrana mitocondriale ha una tipica struttura a doppio strato lipidico ed è vulnerabile a vari fattori di lesione [28] . È anche noto che il danno mitocondriale è una delle principali cause della diminuzione della vitalità cellulare [29] . Pertanto, la compromissione del DMSO sui mitocondri degli astrociti è stata studiata utilizzando la microscopia elettronica a trasmissione. Gli astrociti trattati con DMSO all'1% per 24 ore hanno mostrato gonfiore dei mitocondri (Figura 2A), come rivelato dalla quantificazione dell'area della sezione trasversale mitocondriale (Figura 2B). Il rigonfiamento e la rottura dei mitocondri erano più evidenti dopo l'esposizione al 5% di DMSO, e circa il 35% dei mitocondri mostrava perdita di creste o formavano vacuoli monostrato (Figura 2C).

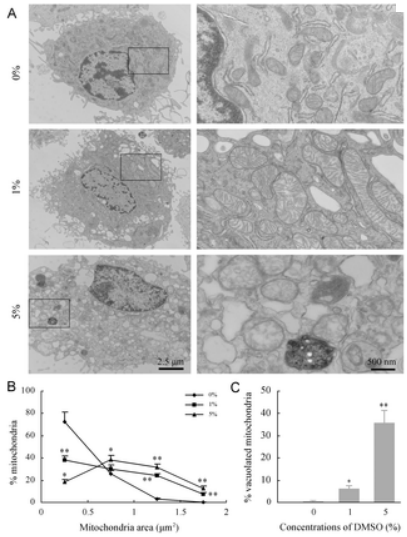

Figura 2. Effetti del DMSO sulle sottostrutture di astrociti corticali di topo in coltura.
(**A**) Micrografie elettroniche a trasmissione rappresentative che mostrano la morfologia sottostrutturale degli astrociti dopo il trattamento con diverse concentrazioni di DMSO per 24 ore. L'interruzione dell'integrità dei mitocondri diventa più grave con l'aumento delle concentrazioni di DMSO. La frammentazione del nucleo, con condensazione e marginalizzazione della cromatina nucleare, è stata frequentemente osservata negli astrociti esposti al 5% di DMSO. (**B**) Quantificazione dell'area della sezione trasversale mitocondriale. I risultati hanno confermato il gonfiore mitocondriale indotto da DMSO, con un significativo spostamento verso destra nella curva di frequenza cumulativa dell'area mitocondriale, rispetto al controllo non

trattato. (**c**) L'analisi quantitativa ha mostrato aumenti della percentuale di vacuolizzazione mitocondriale negli astrociti trattati con DMSO in modo dose-dipendente. I dati sono mostrati come media ± SEM di cinque esperimenti indipendenti. * *P* <0,05 e ** *P* <0,01 rispetto al gruppo di controllo.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447.g002

L'effetto deleterio del DMSO sulla funzione mitocondriale degli astrociti è stato determinato anche misurando il potenziale della membrana mitocondriale (ΔΨm) utilizzando la microscopia a fluorescenza della tetrametilrodamina metilica (TMRE). Il DMSO a concentrazioni nell'1% e nel 5% ha causato riduzioni significative di ΔΨm negli astrociti in coltura, come mostrato nelle Figure 3A e B.

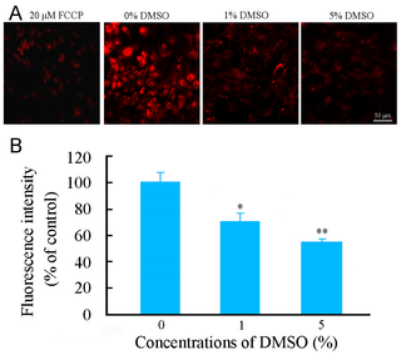

Figura 3. Effetti del DMSO su ΔΨm di astrociti corticali di topo in coltura.
(**A**) Micrografie rappresentative che mostrano ΔΨm, rivelato dalla colorazione fluorescente TMRE, in astrociti trattati con varie concentrazioni di DMSO per 24 ore. La prima micrografia a sinistra è un controllo positivo per i mitocondri depolarizzati incubati con 20 μM FCCP, un disaccoppiatore del trasporto di elettroni e della fosforilazione ossidativa, per 10 minuti prima della colorazione con TMRE. (**B**) L'analisi quantitativa ha rivelato che l'intensità della fluorescenza TMRE era diminuita negli astrociti trattati con DMSO in modo dose-dipendente. I dati sono mostrati come media ± SEM di cinque esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. * *P* <0,05 e ** *P* <0,01 rispetto al gruppo di controllo.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447.g003

Il DMSO ha causato il rilascio del citocromo c mitocondriale (Cyt c) negli astrociti in coltura

È anche noto che l'interruzione dell'integrità mitocondriale provoca un rilascio di Cyt c dallo spazio intermembrana mitocondriale nel citosol [30] . Pertanto, abbiamo studiato gli effetti del DMSO sul rilascio di Cyt c mitocondriale negli astrociti in coltura. I risultati della citometria a flusso hanno mostrato che la concentrazione di Cyt c nel citoplasma degli astrociti è aumentata dopo il trattamento con 1% e 5% di DMSO per 24 ore (Figura 4A-B). Il Western blotting ha ulteriormente confermato che il DMSO ha indotto il rilascio di Cyt c dai mitocondri. Gli astrociti trattati con DMSO avevano bassi livelli di Cyt c nella frazione mitocondriale e alti livelli di Cyt c nella frazione citosolica, rispetto ai controlli intatti (Figura 4C-D).

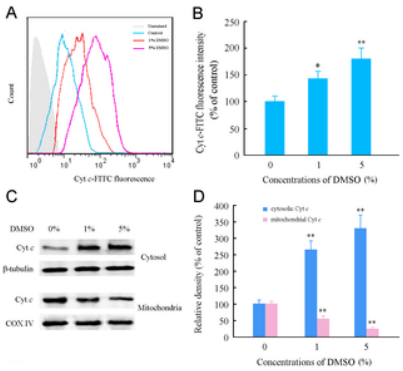

Figura 4. Effetti del DMSO e rilascio di Cyt c mitocondriale e generazione di ROS intracellulare negli astrociti corticali di topo in coltura.
(A) Dati rappresentativi della citometria a flusso che mostrano la fluorescenza mitocondriale Cyt *c* -FITC all'interno del citoplasma degli astrociti trattati con varie concentrazioni di DMSO per 24 ore. (B) Analisi quantitativa dell'intensità della fluorescenza Cyt *c* -FITC. (C) Bande rappresentative di Western blot che mostrano livelli di espressione di Cyt *c* in frazioni citosoliche e mitocondriali di astrociti trattati con varie concentrazioni di DMSO per 24 ore. La β-tubulina e la COX IV, che erano espresse esclusivamente all'interno del citosol e dei mitocondri, rispettivamente, sono state utilizzate come controlli di carico. (D) L'analisi quantitativa della densità ottica relativa del citosol e del Cyt *c* mitocondriale che mostra che il DMSO ha causato la traslocazione di Cyt *c*dai mitocondri nel citoplasma degli astrociti. I dati sono mostrati come una media ± SEM di cinque (per citometria a flusso) o quattro (per Western blot) esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. * *P* <0,05 e ** *P* <0,01 rispetto al gruppo di controllo.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447.g004

Il DMSO ha aumentato la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) negli astrociti in coltura

.

È stato dimostrato che una diminuzione di ΔΨm riduce il metabolismo aerobico e aumenta la generazione di ROS [31] , [32] . Pertanto, la generazione di ROS mitocondriali negli astrociti trattati con DMSO è stata valutata rilevando MitoSOX-Red, un rivelatore altamente selettivo di superossido nei mitocondri di cellule vive, utilizzando la citometria a flusso. L'intensità della fluorescenza Mito-SOX è stata aumentata in modo dipendente dalla concentrazione (Figura 5A-B). Sono stati osservati anche livelli di ROS intracellulari aumentati di DMSO utilizzando una sonda sensibile all'ossidante DCFH-DA e la citometria a flusso (Figura 5C-D).

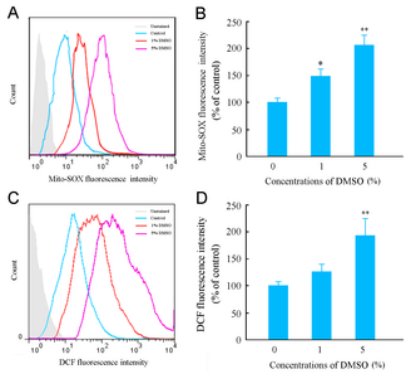

Figura 5. Effetti del DMSO sulla generazione di ROS mitocondriali e intracellulari negli astrociti corticali di topo in coltura.
(**A**) Dati rappresentativi della citometria a flusso che mostrano la fluorescenza Mito-SOX, un indicatore altamente selettivo del superossido nei mitocondri delle cellule vive, in astrociti trattati con varie concentrazioni di DMSO per 24 ore. (**B**) L'analisi quantitativa ha rivelato che l'intensità della fluorescenza Mito-SOX è aumentata negli astrociti trattati con DMSO in modo dose-dipendente. (**C**) Dati rappresentativi della citometria a flusso che mostrano la fluorescenza DCF in astrociti trattati con varie concentrazioni di DMSO per 24 ore. (**D**) L'analisi quantitativa ha mostrato che i livelli di ROS erano aumentati negli astrociti trattati con DMSO al 5% di concentrazione ma non all'1%, rilevando l'intensità di fluorescenza del DCF. (**E**) I dati sono mostrati come media ± SEM di cinque esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. * *P* <0,05, ** *P* <0,01 rispetto al gruppo di controllo. # *P* <0,05, ## *P* <0,01 contro il 5% del gruppo trattato con DMSO.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447.g005

Apoptosi indotta da DMSO di astrociti in coltura

Ci sono prove che il rilascio di Cyt *c* e la generazione di ROS causati dal danno e/o dalla disfunzione dei mitocondri svolgono un ruolo centrale nell'inizio dell'apoptosi [33] – [36] . Pertanto, abbiamo esaminato gli effetti del DMSO sull'apoptosi degli astrociti. L'etichettatura terminale della deossinucleotidil transferasi dUTP nick end (TUNEL) e l'analisi quantitativa hanno rivelato che la percentuale di astrociti apoptotici non era significativamente diversa tra la condizione di base e l'1% di DMSO, ma aumentava del 5% di DMSO (Figura 6A-B). Gli astrociti esposti all'1% o al 5% di DMSO per 24 ore hanno mostrato diminuzioni nell'espressione della proteina Bcl-2 anti-apoptotica e nell'espressione della procaspe-3, mentre aumenti nell'espressione della caspasi-3 scissa, come rivelato dall'analisi Western blot (Figura 6C-D).

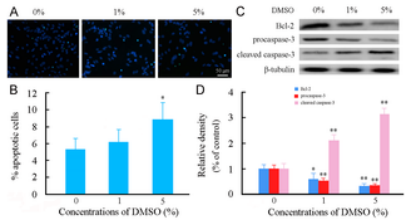

Figura 6. Effetti del DMSO sull'apoptosi di astrociti corticali di topo in coltura.
Gli astrociti sono stati incubati con varie concentrazioni di DMSO per 24 ore. (A) Micrografie rappresentative che mostrano astrociti apoptotici TUNEL positivi (ciano-blu). Nuclei cellulari colorati di contrasto con Hoechst 33342 (blu). (B) Analisi quantitativa dell'apoptosi degli astrociti. (C) Bande rappresentative della macchia occidentale che mostrano livelli di espressione di procaspasi-3, caspasi-3 scissa e Bcl-2 negli astrociti. (D) L'analisi quantitativa ha mostrato che i livelli di espressione di Bcl-2 e procaspasi-3 erano diminuiti, ma il livello di espressione della caspasi-3 scissa era aumentato negli astrociti trattati con 1% o 5% di DMSO. I dati sono mostrati come una media ± SEM di cinque (per TUNEL) o quattro (per Western blot) esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. * *P* <0,05 e ** *P* <0,01 rispetto al gruppo di controllo.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447.g006

Il DMSO ha ridotto l'espressione del trasportatore del glutammato 1 (GLT-1) e del trasportatore del glutammato-aspartato (GLAST) negli astrociti in coltura

Gli astrociti sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi del glutammato nel sistema nervoso centrale da parte dei trasportatori del glutammato che sono vulnerabili allo stress ossidativo [37] . Pertanto, abbiamo esaminato se l'aumento della generazione di ROS ha comportato una down-regulation di GLT-1 e GLAST negli astrociti trattati con DMSO. L'immunoreattività per queste proteine è diminuita negli astrociti esposti all'1% e al 5% di DMSO (Figura 7A-B). L'espressione di GLT-1 e GLAST ridotta con DMSO in un modello dipendente dalla concentrazione è stata confermata dall'analisi Western blot (Figura 7C–D).

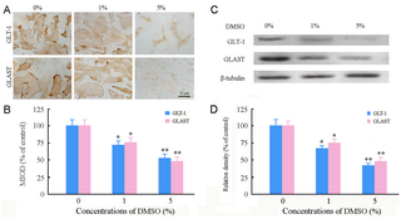

Figura 7. Effetti del DMSO sull'espressione di GLT-1 e GLAST negli astrociti corticali di topo in coltura.
(**A**) Micrografie rappresentative che mostrano l'immunoreattività di GLT-1 e GLAST in astrociti trattati con varie concentrazioni di DMSO per 24 ore. (**B**) Densità ottica integrata media (MIOD) dell'immunocolorazione per GLT-1 e GLAST. (**C**) Bande rappresentative di western blot che mostrano livelli di espressione di GLT-1 e GLAST negli astrociti. (**D**) L'analisi quantitativa ha rivelato che i livelli di proteine GLT-1 e GLAST erano diminuiti negli astrociti trattati con DMSO in modo dose-dipendente. I dati sono mostrati come una media ± SEM di cinque (per immunocolorazione) o quattro (per Western blot) esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. * *P* <0,05 e ** *P* <0,01 rispetto al gruppo di controllo.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447.g007

Discussione

Il DMSO a concentrazioni dello 0,5–1,5% è ampiamente utilizzato come solvente per vari agenti farmacologici sia in colture cellulari che in studi *in vivo* [3] . Tuttavia, gli effetti biologici del DMSO possono essere trascurati, perché un controllo del veicolo non è sempre incorporato nella progettazione degli esperimenti. Uno studio iniziale ha suggerito che l'esposizione di colture cellulari ippocampali primarie a DMSO nell'intervallo 0,5-1,0% per 24 ore non ha effetti significativi sulla sopravvivenza dei neuroni, ma può prevenire la morte neuronale indotta dal glutammato attraverso la soppressione di NMDA- e AMPA- correnti ioniche indotte e afflusso di calcio [38] . Uno studio seguito ha dimostrato che il trattamento con DMSO a concentrazioni dello 0,5% o 1,0% per 6 DIV produce una sostanziale diminuzione del numero di neuroni ippocampali in coltura[12] . Nel presente studio, una concentrazione di DMSO dell'1% non influisce in modo significativo sulla sopravvivenza degli astrociti durante un periodo di esposizione di 24 ore, ma compromette la vitalità cellulare, l'integrità mitocondriale e l'espressione del trasportatore del glutammato. L'esposizione di colture di astrociti a DMSO a concentrazioni del 5% compromette significativamente la sopravvivenza cellulare e aumenta l'apoptosi. Nel complesso, questi risultati forniscono una forte evidenza *in vitro* degli effetti neurofarmacologici e neurotossicologici del DMSO.

La caratteristica anfifilica del DMSO impartisce ampie azioni nei processi di fusione della membrana, crioconservazione e miglioramento della permeabilità della membrana [39] , [40] . Una simulazione di dinamica molecolare che utilizza modelli a grana grossa ha suggerito che il DMSO modula la struttura e le proprietà delle membrane cellulari in modo dipendente dalla concentrazione [27]. Il DMSO induce l'assottigliamento della membrana e aumenta la fluidità del nucleo idrofobico della membrana a basse concentrazioni (<10 mol%), la formazione di pori d'acqua transitori nella membrana a doppio strato al 10-20% in moli e la perdita locale dell'integrità delle membrane fosfolipidiche a concentrazioni più elevate . I risultati attuali hanno dimostrato che gli astrociti di topo in coltura esposti all'1,0% di DMSO per 24 ore presentano alterazioni dell'integrità mitocondriale e ΔΨm, sebbene il loro profilo di crescita generale non sia alterato rispetto a quelli nel mezzo di controllo. Questo risultato suggerisce che la membrana mitocondriale è vulnerabile al DMSO, il che potrebbe essere dovuto alla sua fluidità di membrana relativamente elevata [28] .

I mitocondri sono il centro del metabolismo cellulare e della trasformazione energetica; e il loro malfunzionamento diminuisce la vitalità cellulare [29] , [41] . In accordo con questa nozione, abbiamo dimostrato che il DMSO inibisce la vitalità degli astrociti in modo dose-dipendente, accompagnato da un'interruzione strutturale e funzionale mitocondriale. Gli astrociti esposti a DMSO a concentrazioni dell'1,0% aumentano anche il rilascio di Cyt *c* e l'espressione della caspasi 3 attivata e riducono l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2, supportando la revisione secondo cui la rottura dei mitocondri è un fattore scatenante iniziale delle cascate apoptotiche [28] , [35]. Inoltre, i risultati attuali hanno indicato che il DMSO aumenta in modo dose-dipendente la produzione di ROS derivata dai mitocondri, il che è coerente con l'idea che i mitocondri degenerati siano il sito principale della produzione di ROS [32] . Presi insieme, questi risultati rivelano che la compromissione mitocondriale è un evento primario nella tossicità astrocitaria del DMSO.

Il glutammato, il principale neurotrasmettitore di aminoacidi eccitatori nel cervello, può diventare potenzialmente tossico quando si accumula eccessivamente nello spazio sinaptico [42] . Come accennato in precedenza, gli astrociti sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi del glutammato cerebrale tramite i trasportatori del glutammato [24] . Lo stress ossidativo inibisce l'espressione e la funzione del trasportatore del glutammato, che è stata implicata come una patogenesi principale dell'eccitotossicità del glutammato in una varietà di condizioni patologiche, tra cui ischemia cerebrale [43] , [44] , trauma cranico [45] , epilessia [46] e neurodegenerazione [47] , [48]. I risultati attuali hanno dimostrato che il DMSO provoca una down-regulation di GLT1 e GLAST negli astrociti in coltura. Oltre all'aumento della produzione di ROS, la ridotta vitalità cellulare e la disfunzione mitocondriale possono compromettere la sintesi del trasportatore del glutammato da parte degli astrociti. È stato dimostrato che un'elevata concentrazione di DMSO degrada la struttura della membrana e disturba le strutture proteiche secondarie all'interno delle proteine di membrana [26] , [27] . Ciò può anche contribuire alla diminuzione dell'espressione di GTL1 e GLAST. La down-regulation dei trasportatori del glutammato può portare a eccitotossicità neuronale, esacerbando così il danno neuronale indotto da DMSO. I risultati aiutano a spiegare l'insorgenza dell'epilessia negli esseri umani [14] – [18] e nei ratti [49]a seguito di esposizione ad alta concentrazione di DMSO.

In sintesi, i risultati attuali rivelano che il danno mitocondriale, lo stress ossidativo e l'apoptosi sono coinvolti nella tossicità degli astrociti indotta da DMSO. Il DMSO a concentrazioni dell'1% compromette la vitalità cellulare, l'integrità mitocondriale e l'espressione del trasportatore del glutammato degli astrociti, sebbene non influisca sulla loro sopravvivenza e apoptosi durante un periodo di esposizione di 24 ore. Sono necessari ulteriori studi *in vivo* per valutare se la disfunzione degli astrociti sia coinvolta nelle conseguenze neurocomportamentali dell'esposizione acuta a dosi elevate o croniche a basse dosi al DMSO. L'esplorazione di questi problemi aiuterà la valutazione obiettiva degli effetti farmacologici o tossicologici del DMSO stesso o come solvente o vettore per agenti idrofobici.

Metodi sperimentali

Animali

Topi CD1 adulti (di 8-10 settimane) del peso di 20-25 g sono stati alloggiati 4 per gabbia in una stanza mantenuta a 22±1°C con un ciclo alternato di luce-buio di 12 ore. Cibo e acqua erano disponibili ad libitum. I protocolli sugli animali utilizzati nello studio sono stati approvati dall'Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) dell'Università di medicina di Nanchino.

Colture di astrociti e trattamento farmacologico

Le cortecce cerebrali dei topi CD1 del giorno 1-3 post-natale sono state isolate e dissociate con digestione e triturazione di tripsina allo 0, 125% (Millipore, Billerica, MA, USA) con una pipetta da pascolo lucidata a fiamma. Dopo la filtrazione, le cellule dissociate sono state sospese nel mezzo Eagle's modificato (DMEM) di Dulbecco più il 10% di siero bovino fetale (FBS) (Gibco BRL, Guithersburg, MD, USA), quindi piastrate in flaconi di coltura tissutale rivestiti con 100 mg/ml di poli-L -lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e posta in un incubatore per colture cellulari umidificato a 37°C in un'atmosfera al 95% di aria e al 5% di CO_2. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2 o 3 giorni. Sette o otto giorni dopo la placcatura, le cellule sono state passate, sottoposte a uno scambio parziale di media e incubate per altri 5-6 giorni. Le colture erano costituite da almeno il 95% di astrociti, come determinato mediante immunocolorazione contro la proteina acida fibrillare gliale del marker degli astrociti (GFAP) e il marker microgliale CD11b.

Gli astrociti del secondo passaggio sono stati quindi risospesi in DMEM/10% FBS e placcati in piastre rivestite di poli-L-lisina come segue: piastre per microtitolazione a 24 pozzetti (5×10^5 cellule/pozzetto) per morfologico, immunocitochimico, ΔΨm e saggi di apoptosi, piastre per microtitolazione a 96 pozzetti (2×10^4 cellule/pozzetto) per il test di vitalità e piastre a 6 pozzetti (2×10^6 cellule/pozzetto) per analisi Western blot e citometria a flusso. Le cellule sono state lasciate crescere per 1-2 giorni per raggiungere la confluenza, quindi trattate con diverse concentrazioni (0, 1 e 5%) di DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per 24 ore.

Sopravvivenza degli astrociti e analisi morfologica

Dopo il trattamento con diverse concentrazioni di DMSO per 24 ore, la crescita degli astrociti è stata esaminata da un microscopio a contrasto di fase e 5 aree selezionate casualmente per pozzetto sono state riprese con un ingrandimento di 100 ×. Il numero totale di cellule in ciascuna immagine è stato contato utilizzando il software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). La densità delle cellule (numero di cellule per mm^2) è stata calcolata ed espressa come percentuale delle cellule di controllo non trattate.

Test di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT [50] . Dopo la sostituzione del DMEM fresco, sono stati aggiunti 20 µl di 5 mg/ml di MTT (Sigma-Aldrich) e incubati per 4 ore, il mezzo di coltura è stato scartato e sono stati utilizzati 150 µl di DMSO per sciogliere il precipitato. L'assorbanza è stata misurata a 490 nm utilizzando un lettore microplaccato automatizzato ELx800 (BioTek, Winooski, VT, USA). I risultati sono espressi come percentuale dei valori di controllo.

Microscopia elettronica a trasmissione

Gli astrociti trattati con DMSO sono stati fissati con 4°C di glutaraldeide al 2,5% in tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4) per 2 ore. Le cellule sono state staccate con tripsina allo 0,125% e raccolte mediante centrifugazione per 10 minuti a 1000 *g*, risciacquato con PBS e post-fissato in tetrossido di osmio all'1% con ferricianuro di potassio allo 0,1% per 48 h. I campioni cellulari sono stati disidratati attraverso una serie graduata di etanolo e incorporati in Epon 812. Ultrasezioni spesse sessanta micrometri sono state colorate con acetato di uranile all'1% e citrato di piombo allo 0,1% ed esaminate con un microscopio elettronico Jeol 1200EX (Jeol Ltd., Akishima, Tokyo, Giappone). Dieci astrociti di ciascun gruppo sono stati catturati casualmente con un ingrandimento di × 12000 e utilizzati per la quantificazione dell'area della sezione trasversale mitocondriale utilizzando un sistema di analisi Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc., San Francisco, CA, USA). È stata contata la percentuale di mitocondri vacuolati, caratterizzati da perdita parziale o completa delle creste.

Misura di ΔΨm

ΔΨm è stato valutato utilizzando un test su cellule vive con il colorante cationico lipofilo fluorescente TMRE (Invitrogen, Karlsruhe, Germania). Questo colorante è un colorante rosso-arancio, con carica positiva, permeante cellulare che si accumula facilmente nei mitocondri attivi a causa della loro relativa carica negativa [51]. Dopo il trattamento con diverse concentrazioni di DMSO per 24 ore, gli astrociti in coltura sono stati colorati con 200 nM TMRE per 30 minuti a 37°C, quindi lavati due volte in mezzo e risospesi in PBS. Le immagini fluorescenti sono state immediatamente acquisite utilizzando un cannocchiale a fluorescenza invertita Zeiss AX10 (Carl Zeiss Microimaging Inc., Germania). Alcuni campioni incubati con 20 µM di carbonilcianuro-p-trifluorometossifenilidrazone (FCCP), un disaccoppiatore del trasporto di elettroni e della fosforilazione ossidativa, per 10 minuti prima della colorazione con TMRE, sono serviti come controllo positivo per i mitocondri depolarizzati. La densità di fluorescenza TMRE è stata analizzata utilizzando un sistema di analisi Image-Pro Plus 6.0. I dati sono presentati come percentuale dei valori di controllo.

Saggio del rilascio di Cyt *c*

Dopo il trattamento con diverse concentrazioni di DMSO per 24 ore, gli astrociti in coltura sono stati incubati in un tampone di permeabilizzazione a 4°C (100 mM KCl, 100 µg/ml di digitonina in PBS) per 3-5 min. Le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% in PBS per 20 minuti a temperatura ambiente, lavate due volte con PBS e staccate enzimaticamente. Le cellule sono state quindi centrifugate, risospese in 1 ml di tampone bloccante (3% di albumina di siero bovino, 0,05% di saponina in PBS) per 1 ora a temperatura ambiente e incubate con anti- *Cit c monoclonale di topo*(1:2000; Abcam, San Francisco, CA, USA) durante la notte a 4°C. Le cellule sono state risciacquate due volte con PBS, quindi incubate con anticorpo secondario coniugato FITC (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) per 1 ora a temperatura ambiente. I campioni sono stati analizzati da un citometro a flusso FACSCalibur (Becton-Dickinson) a una lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 525 nm.

Misurazione della generazione di ROS mitocondriali e intracellulari

La generazione di ROS mediata dai mitocondri è stata rilevata con l'indicatore del superossido mitocondriale MitoSOX-Red. I ROS intracellulari sono stati rilevati utilizzando una sonda fluorescente sensibile all'ossidazione 2'-7'-diclorodiidrofluoresceina diacetato (DCFH-DA). DCFH-DA è stato deacetilato intracellulare da esterasi non specifica, che è stato poi ulteriormente ossidato da ROS al composto fluorescente 2,7-diclorofluoresceina (DCF) [52] . Gli astrociti sono stati trattati con diverse concentrazioni di DMSO (0, 1 e 5%). Le cellule sono state quindi lavate due volte in PBS e poste in un'incubatrice umidificata (5% CO_2e 95% di aria) a 37°C con

5 mmol/L di MitoSOX-Red (Invitrogen) per 15 min o 2,5 μg/ml DCFH-DA (Sigma-Aldrich) in PBS per 30 min. Successivamente, le cellule sono state lavate due volte in mezzo di coltura e tripsinizzate. Il pellet cellulare è stato risospeso in PBS seguito da analisi su un citometro a flusso FACSCalibur (Becton-Dickinson).

Isolamento della frazione mitocondriale e della frazione citosolica

Ciascun campione cellulare è stato omogeneizzato in un tampone di lisi ghiacciato contenente mannitolo 200 mM, HEPES-KOH 80 mM (pH 7,4) e il cocktail di inibitore della proteasi. Gli omogenati sono stati centrifugati brevemente a 750 rpm per 10 minuti a 4°C in una centrifuga Eppendorf. Dopo aver rimosso la metà superiore dei surnatanti, il resto dei surnatanti è stato centrifugato a 8.000 rpm per 20 minuti a 4°C. I pellet sono stati quindi lavati 3 volte e sospesi nel tampone di lisi come frazione mitocondriale. I surnatanti di centrifugazione a 8.000 rpm sono stati centrifugati a 100.000 rpm per 1 ora a 4°C. I supernatanti risultanti erano la frazione citosolica. La concentrazione proteica di ciascun campione è stata determinata utilizzando il saggio Bradford.

Analisi Western blot

Gli astrociti trattati con DMSO sono stati lavati con PBS privo di Ca^{2+} e Mg^{2+} , quindi staccati dalle piastre mediante raschiatura e raccolti mediante centrifugazione per 5 minuti a 1500 *g*. I pellet cellulari sono stati sospesi in 60 μl di tampone di lisi contenente 200 mM di fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) e omogeneizzati su ghiaccio da un omogeneizzatore ad ultrasuoni. I lisati sono stati centrifugati (12.000 rpm per 15 minuti a 4°C) e la concentrazione proteica negli estratti è stata determinata utilizzando il saggio Bradford. I campioni degli estratti cellulari o delle frazioni mitocondriali e citosoliche sono stati denaturati con un tampone campione SDS e separati da SDS-PAGE al 10%. Le proteine sono state trasferite su membrane PVDF seguite da membrane bloccanti con latte scremato al 5% sciolto in TBST (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,5, 150 mmol/L NaCl, 0,1% Tween20) a temperatura ambiente per 2 ore. Dopo tre lavaggi con tampone TBST, le membrane sono state incubate con anti -*Cyt c monoclonale di topo*(1:2000; Abcam), anticorpo policlonale di coniglio contro la procaspasi 3 (1:1200; Abcam), anticorpo policlonale di coniglio contro la caspasi 3 scissa (1:800; Abcam), anticorpo policlonale di coniglio contro Bcl-2 (1:200; Santa Cruz BioTech, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo policlonale di coniglio contro GLT-1 (1:500; Santa Cruz BioTech) o anticorpo policlonale di coniglio contro GLAST (1:500, Santa Cruz BioTech), anticorpo policlonale di coniglio contro COX IV (1:1200; Abcam) o anticorpo monoclonale di topo contro la β-tubulina (1:3000; Abcam) a 4°C durante la notte. Le bande sono state rilevate con anticorpi secondari coniugati con biotina (1:200, Vector Laboratories), risciacquati e visualizzati mediante ECL più sistema di rilevamento Western blotting. La β-tubulina è stata utilizzata come controllo interno.

Saggio di apoptosi

L'apoptosi cellulare è stata rilevata dal test TUNEL utilizzando il kit di rilevamento della morte cellulare in situ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania). Dopo il trattamento con diverse concentrazioni di DMSO, gli astrociti sui vetrini coprioggetto sono stati lavati con PBS e fissati in paraformaldeide al 4% appena preparata per 1 ora. Dopo permeabilizzazione con Triton X-100 allo 0,1% (sciolto in citrato di sodio allo 0,1%) per 5 minuti, i vetrini coprioggetto sono stati incubati con 20 μg/ml di proteinasi K per 15 minuti a 37°C, quindi incubati con 100 μl di miscela di reazione TUNEL per 1 h a 37°C. La reazione è stata interrotta lavando con PBS per 3 volte. Dopo la colorazione di contrasto con Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), le cellule TUNEL positive sono state catturate utilizzando un microscopio digitale Leica DM4000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania). È stata contata la percentuale di astrociti TUNEL positivi nella coltura.

Immunocolorazione

Dopo aver lavato 3 volte in PBS, gli astrociti su vetrini coprioggetto o sezioni ippocampali decerate sono stati trattati con Triton X-100 al 2% contenente 0,5% di albumina di siero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) per 1 ora. Sono stati quindi incubati con anticorpi monoclonali di topo contro GFAP (1:1000; Sigma-Aldrich), anticorpi policlonali di coniglio contro GLT-1 (1:400; Santa Cruz) o anticorpi policlonali di coniglio contro GLAST (1:400, Santa Cruz) a 4°C durante la notte. Dopo i risciacqui con PBS, sono stati applicati anticorpi secondari appropriati per 1 ora a 37°C. I segnali sono stati visualizzati mediante 3,3′-diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich) e catturati utilizzando un microscopio digitale Leica DM4000B. La densità ottica integrata media (MIOD) è stata misurata per valutare i livelli di espressione di GFAP, GLT-1 o GLAST utilizzando il software Image J. I dati sono presentati come percentuale dei valori di controllo.

analisi statistica

I dati sono espressi come media ± SEM. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS, versione 16.0 (SPSS Inc., USA). La significatività della differenza è stata valutata con procedure di analisi della varianza (ANOVA) seguite dal test di Bonferroni. *P* -valori inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Contributi dell'autore

Ideato e progettato gli esperimenti: MX. Ha eseguito gli esperimenti: CY J. Guo LB. Analizzato i dati: J. Gao. Contributo di reagenti/materiali/strumenti di analisi: CY J. Guo LB. Ha scritto l'articolo: MX CM ZC LW.

Riferimenti

1. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C (2003) Utilizzo multidisciplinare del dimetilsolfossido: aspetti farmacologici, cellulari e molecolari. Biochem Pharmacol 65: 1035–1041.
   Visualizza l'articolo • Google Scholar

2. Balakin KV, Savchuk NP, Tetko IV (2006) Approcci in silico alla previsione della solubilità acquosa e DMSO di composti simili a farmaci: tendenze, problemi e soluzioni. Curr Med Chem 13: 223–241.
   Visualizza l'articolo • Google Scholar

3. Jacob SW, de la Torre JC (2009) Farmacologia del dimetilsolfossido nel danno cardiaco e del SNC. Pharmacol Rep 61: 225–235.
   Visualizza l'articolo • Google Scholar

4. Cavaletti G, Oggioni N, Sala F, Pezzoni G, Cavalletti E, et al. (2000) Effetto sul sistema nervoso periferico del dimetilsolfossido somministrato per via sistemica nel ratto: uno studio neurofisiologico e patologico. Tossicolo Lett 118, 103–107.

5. Authier N, Dupuis E, Kwasiborski A, Eschalier A, Coudoré F (2002) Valutazione comportamentale della neurotossicità del dimetilsolfossido nei ratti. Tossico Lett 132: 117–121.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

6. Fossum EN, Lisowski MJ, Macey TA, Ingram SL, Morgan MM (2008) La microiniezione del veicolo dimetilsolfossido (DMSO) nel grigio periacqueduttale modula l'antinocicezione della morfina. Brain Res 1204: 53–58.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

7. Turan NN, Akar F, Budak B, Seren M, Parlar AI, et al. (2008) Come il DMSO, un solvente ampiamente utilizzato, influisce sulla lesione del midollo spinale. Ann Vasc Surg 22: 98–105.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

8. Budinich CS, Tucker LB, Lowe D, Rosenberger JG, McCabe JT (2013) Effetti motori e comportamentali a breve e lungo termine della somministrazione di diazossido e dimetilsolfossido nel topo dopo trauma cranico. Pharmacol Biochem Behav 108: 66–73.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

9. Shimizu S, Simon RP, Graham SH (1997) Il trattamento con dimetilsolfossido (DMSO) riduce il volume dell'infarto dopo l'ischemia cerebrale focale permanente nei ratti. Neurosci Lett 239: 125–127.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

10. Phillis JW, Estevez AY, O'Regan MH (1998) Effetti protettivi degli spazzini di radicali liberi, dimetilsolfossido ed etanolo, nell'ischemia cerebrale nei gerbilli. Neurosci Lett 244: 109–111.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

11. Di Giorgio AM, Hou Y, Zhao X, Zhang B, Lyeth BG, et al. (2008) Il dimetilsolfossido fornisce neuroprotezione in un modello di lesione cerebrale traumatica. Ripristina Neurol Neurosci 26: 501–507.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

12. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, et al. (2009) Il dimetilsolfossido (DMSO) produce un'apoptosi diffusa nel sistema nervoso centrale in via di sviluppo. Neurobiol Dis 34: 1–10.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

13. Julien C, Marcouiller F, Bretteville A, El Khoury NB, Baillargeon J, et al. (2012) Il dimetilsolfossido induce iperfosforilazione Tau diretta e indiretta. PLoS ONE 7: e40020.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

14. Windrum P, Morris TC (2003) Grave neurotossicità a causa del dimetilsolfossido dopo il trapianto di cellule staminali del sangue periferico. Trapianto di midollo osseo 31: 315.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

15. Bauwens D, Hantson P, Laterre PF, Michaux L, Latinne D, et al. (2005) Convulsioni ricorrenti ed encefalopatia sostenuta associata all'infusione di cellule staminali conservate con dimetilsolfossido. Linfoma di Leuk 46: 1671–1674.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

16. Mueller LP, Theurich S, Christopeit M, Grothe W, Muetherig A, et al. (2007) Neurotossicità per infusione di cellule staminali del sangue periferico criopreservate con dimetilsolfossido in pazienti con e senza malattia cerebrale preesistente. Eur J Ematol 78: 527–531.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

17. Júnior AM, Arrais CA, Saboya R, Velasques RD, Junqueira PL, et al. (2008) Neurotossicità associata all'infusione di cellule progenitrici ematopoietiche conservate con dimetilsolfossido. Trapianto di midollo osseo 41: 95–96.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

18. Abdelkefi A, Lakhal A, Moojat N, Hamed LB, Fekih J, et al. (2009) Grave neurotossicità associata al dimetilsolfossido dopo PBSCT. Trapianto di midollo osseo 44: 323–324.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

19. Dhodapkar M, Goldberg SL, Tefferi A, Gertz MA (1994) Encefalopatia reversibile dopo infusione di cellule staminali del sangue periferico crioconservato. Am J Hematol 45: 187–188.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

20. Higman MA, Port JD, Bezuchamp NJ Jr, Chen AR (2000) Leucoencefalopatia reversibile associata alla reinfusione di cellule staminali conservate con DMSO. Trapianto di midollo osseo 26: 797–800.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

21. Marcacci G, Corazzelli G, Becchimanzi C, Arcamone M, Capobianco G, et al. (2009) Encefalopatia associata a DMSO durante l'infusione di cellule staminali periferiche autologhe: un ruolo predisponente dell'esposizione precondizionante ad agenti che penetrano nel SNC? Trapianto di midollo osseo 44: 133–135.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

22. Otrock ZK, Beydoun A, Barada WM, Masroujeh R, Hourani R, et al. (2008) Amnesia globale transitoria associata all'infusione di cellule staminali del sangue periferico autologo criopreservate con DMSO. Ematologica 93: e36–37.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

23. Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - più di una semplice colla cerebrale. Natura 457: 675–677.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

24. Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrociti, dalla colla cerebrale agli elementi di comunicazione: la rivoluzione continua. Nat Rev Neurosci 6: 626–640.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

25. Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C (2006) Disfunzione degli astrociti nei disturbi neurologici: una prospettiva molecolare. Nat Rev Neurosci 7: 194–206.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

26. Notman R, Noro M, O'Malley B, Anwar J (2006) Basi molecolari per l'azione del dimetilsolfossido (DMSO) sulle membrane lipidiche. J Am Chem Soc 128: 13982–13983.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

27. Gurtvenko AA, Anwar J (2007) Modulazione della struttura e delle proprietà delle membrane cellulari: il meccanismo d'azione molecolare del dimetilsolfossido. J Phys Chem B 111: 10453–10460.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

28. Sesso A, Belizário JE, Marques MM, Higuchi ML, Schumacher RI, et al. (2012) Gonfiore mitocondriale e rottura incipiente della membrana esterna nelle cellule preapoptotiche e apoptotiche. Anat Rec (Hoboken) 295: 1647–1659.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

29. Gogvadze V, Orrenius S (2006) Regolazione mitocondriale della morte cellulare apoptotica. Chem Biol Interagisci 163: 4–14.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

30. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, et al. (2006) Meccanismi di rilascio del citocromo c dai mitocondri. La morte cellulare differisce 13: 1423–1433.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

31. Murphy MP (2009) Come i mitocondri producono specie reattive dell'ossigeno. Biochimica J 417: 1–13.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

32. Suski JM, Lebiedzinska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, et al. (2012) Relazione tra potenziale di membrana mitocondriale e formazione di ROS. Metodi Mol Biol 810: 183–205.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

33. Chandra J, Samali A, Orrenius S (2000) Attivazione e modulazione dell'apoptosi da stress ossidativo. Radica libera Biol Med 29: 323–333.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

34. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002) Il rilascio di citocromo c dai mitocondri procede in due fasi. Proc Natl Acad Sci USA 99: 1259–1263.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

35. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2006) Vie multiple di rilascio del citocromo c dai mitocondri in apoptosi. Biochim Biophys Acta 57: 639–647.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

36. Tsujimoto Y, Shimizu S (2007) Ruolo della transizione di permeabilità della membrana mitocondriale nella morte cellulare. Apoptosi 12: 835–840.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

37. Trotti D, Danbolt NC, Volterra A (1998) I trasportatori del glutammato sono ossidanti-vulnerabili: un legame molecolare tra neurodegenerazione ossidativa ed eccitotossica? Tendenze Pharmacol Sci 19: 328–334.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

38. Lu C, Mattson MP (2001) Il dimetilsolfossido sopprime le correnti ioniche indotte da NMDA e AMPA e l'afflusso di calcio e protegge dalla morte eccitotossica nei neuroni dell'ippocampo. Esp Neurolo 170: 180–185.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

39. Yu ZW, Quinn PJ (1998) Effetti di solvatazione del dimetilsolfossido sulla struttura dei doppi strati fosfolipidici. Biophys Chem 70: 35–39.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

40. Capriotti K, Capriotti JA (2012) Dimetilsolfossido: storia, chimica e utilità clinica in dermatologia. J Clin Aesthet Dermatol 5: 24–26.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

41. Borutaite V (2010) I mitocondri come decisori nella morte cellulare. Ambiente Mol Mutageno 51: 406–416.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

42. Tapia R (1996) Rilascio e assorbimento di glutammato in relazione all'eccitotossicità. Rev Bras Biol 56: 165–174.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

43. An SJ, Kang TC, Park SK, Hwang IK, Cho SS, et al. (2002) Danno ossidativo al DNA e alterazione delle espressioni del trasportatore del glutammato nell'area Ca1 dell'ippocampo subito dopo l'insulto ischemico. Cellule moli 13: 476–480.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

44. Zhao B, Chen Y, Sun X, Zhou M, Ding J, et al. (2012) Gli alcaloidi fenolici del rizoma di Menispermum dauricum proteggono dal danno da ischemia cerebrale attraverso la regolazione della generazione di GLT-1, EAAC1 e ROS. Molecole 17: 2725–2737.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

45. Rao VL, Başkaya MK, Doğan A, Rothstein JD, Dempsey RJ (1998) La lesione cerebrale traumatica riduce le proteine del trasportatore del glutammato gliale (GLT-1 e GLAST) nel cervello di ratto. J Neurochem 70: 2020–2027.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

46. Gorter JA, Van Vliet EA, Proper EA, De Graan PN, Ghijsen WE, et al. (2002) Le alterazioni dei trasportatori del glutammato nella riorganizzazione del giro dentato sono associate a una progressiva attività convulsiva nei ratti epilettici cronici. J Comp Neurol 442: 365–377.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

47. Sheldon AL, Robinson MB (2007) Il ruolo dei trasportatori del glutammato nelle malattie neurodegenerative e potenziali opportunità di intervento. Neurochem Int 51: 333–355.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

48. Kim K, Lee SG, Kegelman TP, Su ZZ, Das SK, et al. (2011) Ruolo del trasportatore di amminoacidi eccitatori-2 (EAAT2) e del glutammato nella neurodegenerazione: opportunità per lo sviluppo di nuove terapie. J Cell Physiol 226: 2484–2493.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

49. Kovács Z, Czurkó A, Kékesi KA, Juhász G (2011) L'effetto del dimetilsolfossido somministrato per via intraperitoneale sull'attività epilettica simile all'assenza di ratti WAG/Rij che si muovono liberamente. J. Neurosci. Metodi 197: 133–136.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

50. Zeng XN, Sun XL, Gao L, Fan Y, Ding JH, et al. (2007) La carenza di acquaporina-4 regola l'assorbimento del glutammato e l'espressione di GLT-1 negli astrociti. Mol. Cellula. Neurosci 34: 34–39.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

51. Chazotte B (2011) Etichettatura dei mitocondri con TMRM o TMRE. Cold Spring Harb Protocollo 2011: 895–897.
Visualizza l'articolo • Google Scholar

52. Eruslanov E, Kusmartsev S (2010) Identificazione di ROS mediante DCFDA ossidato e citometria a flusso. Metodi Mol Biol 594: 57–72.
Visualizza l'articolo • Google Scholar